

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 00-F-061PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/08253	国際出願日 (日.月.年) 22.11.00	優先日 (日.月.年) 24.11.99
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

This Page Blank (uspto)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 44, (10月.1999), Morris P., et al. "Phospho-Carboxyl-Terminal Domain Binding and the Role of a Prolyl Isomerase in Pre-mRNA 3'-End Formation", p. 31583-31587	1-7
A	EMBL/GenBank/DDBJ, Accession No. AL137437	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.01.01

国際調査報告の発送日

23.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

This Page Blank (uspto)

明細書

WW ドメインを有するヒト核蛋白質とそれをコードするポリヌクレオチド

5 技術分野

この出願の発明は、ヒト細胞の核に存在し、WW ドメインを有する新規蛋白質と、この蛋白質をコードしているポリヌクレオチドおよびこの蛋白質に対する抗体に関するものである。

この発明の蛋白質および抗体は、各種疾患の診断および治療に有用であり、この発明のポリヌクレオチドは、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として有用である。また、ポリ

10 ヌクレオチドはこの発明の蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることが出来る。

背景技術

核蛋白質とは、細胞核の中で機能している蛋白質の総称である。核内には生物の設計図であるゲノム DNA が存在しており、核蛋白質はこれらのゲノム DNA の複製、転写調節などに関与している。核蛋白質の中で機能が明らかになっている代表的なものは、転写因子、スプライ

15 シング因子、核内レセプター、細胞周期調節因子、癌抑制因子などがある。これらの因子は、発生・分化などの生命現象のみならず、癌等の疾患とも密接に関係している（村松正寛編、NEW メディカルサイエンス、「転写のしくみと疾患」）。したがって、これらの核蛋白質は、特定遺伝子の転写・翻訳を調節する低分子医薬品を開発するためのターゲット蛋白質として

20 の可能性を秘めており、できるだけ多くの核蛋白質を得ることが望まれている。

WW ドメインとは SH2、SH3、PH、PTB ドメインと類似した蛋白質-蛋白質相互作用モチーフの新しいファミリーである。このドメインは、2 個の保存されたトリプトファンを持つ約 40 アミノ酸残基からなり、SH3 ドメインと同様にプロリンリッチなアミノ酸配列に結合することが知られている(H. I. Chen and M. Sudol. (1995) Proc. Natl. Sci. 92, 7819-

25 7823)。WW ドメインとそのリガンドが結合したものの X 線結晶解析の結果、立体構造は SH3 と異なることが判明している(M. J. Macias et al. (1996) Nature, 382, 646-649)。他のプロテインモチーフと同様に細胞骨格系(P. Bork and M. Sudol (1994) TIBS, 19, 531-533)、情報伝達系に関与する蛋白質(H. I. Chen and M. Sudol. (1995) Proc. Natl.Sci.92,

7819-7823)、蛋白分解系のユビキチン-プロテインリガーゼ(O. Staub et al. (1996) EMBO J. 15, 2371-2380)、転写活性化因子(P. Bork and M. Sudol (1994) TIBS,19, 531-533)などに含まれており、細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしていると考えられている。

- 5 この出願は、ヒト細胞の核に存在する新規蛋白質、この蛋白質をコードするポリヌクレオチドおよびこのヒト核蛋白質に対する抗体を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下(1)～(7)の発明を提供する。

10

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、単離・精製されたヒト核蛋白質。

- (2) 前記発明(1)の蛋白質をコードし、配列番号 2 の塩基配列を含むポリヌクレオチド。

- 15 (3) 配列番号 2 の塩基配列からなる前記発明(2)のポリヌクレオチド。

- (4) 配列番号 3 またはその一部連続配列からなるポリヌクレオチドがストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヒトゲノム DNA 断片。

- 20 (5) 前記発明(2)または(3)のポリヌクレオチドをインビトロ翻訳あるいは宿主細胞内で発現しうる発現ベクター。

- (6) 前記発明(5)の発現ベクターによる形質転換体であって、前記発明(1)のヒト核蛋白質を生産しうる形質転換細胞。

25

- (7) 前記発明(1)のヒト核蛋白質に対する抗体。

発明を実施するための最良の形態

この出願の前記発明(1)の蛋白質は、ヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、配列番号 1 のアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを用いて組換え DNA 技術で生産する方法などにより取得することができるが、組換え DNA 技術で取得する方法が好ましく用いられる。例えば、発明(2)または(3)のポリヌクレオチドを有するベクターからインビトロ転写によって RNA を調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで蛋白質を発現できる。またポリヌクレオチドを公知の方法により適当な発現ベクターに組換えれば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞で、ポリヌクレオチドがコードしている蛋白質を大量に発現させることができる。

10

発明(1)の蛋白質をインビトロ翻訳で DNA を発現させて生産させる場合には、この発明(2)または(3)のポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを有するベクターに組換え(発明(5))、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含む、ウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、発明(1)の蛋白質をインビトロで生産することができる。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

15

発明(1)の蛋白質を、大腸菌などの微生物で DNA を発現させて生産させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、発明(2)または(3)のポリヌクレオチドを組換えた発現ベクター(発明(5))を作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体(発明(6))を培養すれば、このポリヌクレオチドがコードしている蛋白質を微生物内で大量生産することができる。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドン

25

を付加して発現させれば、任意の領域を含む蛋白質断片を得ることができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。この融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによってこのポリヌクレオチドがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、

pGEX 発現システムなどが例示できる。

発明(1)の蛋白質を、真核細胞で DNA を発現させて生産させる場合には、発明(2)または(3)のポリヌクレオチドの翻訳領域を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換え（発明(5)）、真核細胞内に導入すれば（発明(6)）、
5 発明(1)の蛋白質を真核細胞内で生産することができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pYES2 などが例示できる。また、pIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1などを発現ベクターとして用いれば、His タグ、FLAG タグ、GFP など各種タグを付加した融合蛋白質として発現させることもできる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、発明(1)の蛋白質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いる
10 ことができる。

発明(1)の蛋白質を原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的蛋白質を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせる行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性
20 クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

発明(1)の蛋白質には、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片（5アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を作製するための抗原として用いることができる。また、発明(1)の蛋白質には、他の任意の蛋白質との融合蛋白質も含まれる。例えば、実施例に挙げたグルタチン-S-トランスフェラーゼ（GST）や緑色蛍光蛋白質（GFP）との融合蛋白質などが例示できる。
25

発明(2)および(3)のポリヌクレオチド (cDNA) は、例えばヒト細胞由来 cDNA ライブラリーからクローン化することができる。cDNA はヒト細胞から抽出したポリ(A)⁺RNAを鋳型として合成する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。cDNAは、岡山-Berg法 (Okayama, H. and Berg, P., (1982) Mol. Cell Biol. 2, 161-170)、Gubler-Hoffman法 (Gubler, U. and Hoffman, (1983) J. Gene 25, 263-269) などいかなる方法を用いて合成してもよいが、完全長クローンを効率的に得るためには、実施例にあげたようなキャッピング法 (Kato, S. et al.(1994) Gene, 150, 243-250) を用いることが望ましい。

10 発明(2)のポリヌクレオチドは、配列番号 2 の塩基配列を含むことを特徴とするものであり、例えば、配列番号 3 の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、2669bp からなる塩基配列を有し、2115bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を有していた。この ORF は、704 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。発明(3)のポリヌクレオチドは、この ORF を構成する 2115bp の塩基配列 (配列番号 2) からなっている。発明(2)または(3)の cDNA を大腸菌や動物培養細胞内で発現させると、約 80kDa の蛋白質が得られた。この蛋白質は RNA
15 ポリメラーゼ II の C 末端ドメインと結合することから、転写制御に関与していると考えられる。

発明(1)の蛋白質は、どの組織でも発現しているので、配列番号 2 あるいは配列番号 3 に記載のポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、
20 ヒト細胞から作製したヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、発明(2)または(3)のポリヌクレオチドと同一のクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて、目的 cDNA を合成することもできる。

25

一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号 2 あるいは配列番号 3 において、1 または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされているポリヌクレオチドも発明(3)および(4)の範疇にはいる。

同様に、これらの変更によって生じる、1または複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の活性を有する限り、発明(1)の範疇に入る。

- 5 発明(2)または(3)のポリヌクレオチドには、配列番号 2 あるいは3で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含む DNA 断片 (10bp 以上) も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなる DNA 断片もこの範疇にはいる。これらの DNA 断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。
- 10 発明(4)は、配列番号 3 またはその一部連続配列からなるポリヌクレオチドがストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするヒトゲノム DNA 断片である。ここで、ストリンジेंट (stringent) な条件とは、配列番号 3 の塩基配列またはその一部連続配列 (30bp 以上) からなるポリヌクレオチドと、染色体由来のゲノム DNA との選択的かつ検出可能な特異的結合を可能とする条件である。ストリンジेंट条件は、塩濃度、有機溶媒 (例えば、ホルムアミド)、
- 15 温度、およびその他公知の条件によって定義される。すなわち、塩濃度を減じるか、有機溶媒濃度を増加させるか、またはハイブリダイゼーション温度を上昇させるかによってストリンジエンシー (stringency) は増加する。例えば、ストリンジेंटな塩濃度は、通常、NaCl 約 750 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 75 mM 以下、より好ましくは NaCl 約 500 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 50 mM 以下、最も好ましくは NaCl 約 250 mM 以下およびク
- 20 エン酸三ナトリウム約 25 mM 以下である。ストリンジेंटな有機溶媒濃度は、ホルムアミド約 35%以上、最も好ましくは約 50%以上である。ストリンジेंटな温度条件は、約 30°C以上、より好ましくは約 37°C以上、最も好ましくは約 42°C以上である。その他の条件としては、ハイブリダイゼーション時間、洗浄剤 (例えば、SDS) の濃度、およびキャリアーDNA の存否等であり、これらの条件を組み合わせることによって、様々なストリンジエンシーを設定することが
- 25 とができる。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄の条件もストリンジエンシーに影響する。この洗浄条件もまた、塩濃度と温度によって定義され、塩濃度の減少と温度の上昇によって洗浄のストリンジエンシーは増加する。例えば、洗浄のためのストリンジेंटな塩条件は、好ましくは NaCl 約 30 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 3 mM 以下、最も好ましくは NaCl 約

15 mM 以下およびクエン酸三ナトリウム約 1.5 mM 以下である。洗浄のためのストリンジェントな温度条件は、約 25°C 以上、より好ましくは約 42°C 以上、最も好ましくは約 68°C 以上である。発明(4)のゲノム DNA 断片は、例えば、前記のポリヌクレオチドをプローブとして、以上のとおりのストリンジェントはハイブリダイゼーションおよび洗浄処理により、ヒト染色体 DNA

5 から調製したゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。

この発明(4)のゲノム DNA 断片には、発明(1)の蛋白質コード領域に対する発現制御領域（プロモーター／エンハンサー、サプレッサー配列等）が含まれる。これらの発現制御配列は、例えば、発明(1)の蛋白質の *in vivo* 発現を制御する物質をスクリーニングするための材料として有用である。

10

発明(7)の抗体は、発明(1)の蛋白質を抗原として用いて動物を免疫した後、血清から得ることが出来る。抗原としては配列番号 1 のアミノ酸配列に基づき化学合成したペプチドや、真核細胞や原核細胞で発現させた蛋白質を用いることが出来る。あるいは、上記の真核細胞用発現ベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる（例えば、特開平 7-313187 号公報の発明）。動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリなどが用いられる。免疫した動物の脾臓から採取した B 細胞をミエローマと融合させてハイブリドーマを作製すれば、発明(1)の蛋白質に対するモノクローナル抗体を産生することができる。

15

20

実施例

次に実施例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、DNA の組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献(“Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合は宝酒造社製のものをを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。cDNA 合成は文献 (Kato, S. et al.(1994) Gene, 150, 243-250) に従った。

25

(i) cDNA クローニング

ヒト完全長 cDNA ライブラリー (WO97/03190 記載) から選択した cDNA クローンの大規模塩基配列決定の結果、クローン HP03494 を得た。このクローンは、291bp の 5'非翻訳領域、2115bp の ORF、263bp の 3'非翻訳領域からなる構造を有していた (配列番号 3)。

- 5 ORF は 704 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。

この蛋白質のアミノ酸配列 (配列番号 1) を用いてプロテインデータベースを検索したが、類似性を有する既知蛋白質はなかった。また、この cDNA の塩基配列を用いて GenBank を検索したところ、EST の中に 90%以上の相同性を有するもの (例えば、アクセッション番号 A1758365) が存在したが、部分配列なのでこの発明の蛋白質と同じ蛋白質をコードしているかどうかは判定できない。

モチーフ配列検索を行ったところ、表 1 に示したように、43 番目から 78 番目までの領域が、WW ドメインと類似性を有していた。49 番目と 72 番目のトリプトファン、75 番目のプロリンが、これまで知られている全ての WW ドメインに保存されているアミノ酸残基である。

15

表 1

蛋白質	位置	アミノ酸配列	登録番号
保存配列		— W — G — Y Y — N — W — P —	
HP03494	43	ELVHAGWEKWSRRENRPYYFNRFTNQSLWEMPVLGQHD	
Npw38	46	EGLPPSWYKVFDPSCGLPYYNADTDLVSMSPHDPNSV	BAA76400
20 Yap_Human	171	VPLPAGWEMAKTSS. GQRYFLNHIDQTTTWQDPRKAMLS	P46937
Yap_Chick-1	169	VPLPPGWEMAKTPS. GQRYFLNHIDQTTTWQDPRKAMLS	P46936
Yap_Mouse-1	156	VPLPAGWEMAKTSS. GQRYFLNHIDQTTTWQDPRKAMLS	P46938
Ned4_Mouse-1	40	SPLPPGWEERQDVL. GRYYVNHESRRTQWKRPSPDDDL	P46935
Ned4_Human-1	218	SPLPPGWEERQDIL. GRYYVNHESRRTQWKRPDPQDNL	P46934
25 Ned4_Mouse-2	196	SGLPPGWEEKQDDR. GRSYYVDHNSKTTTWSKPTMQDDP	P46935
Ned4_Human-2	375	SGLPPGWEEKQDER. GRSYYVDHNSRTTTWTKPTVQATV	P46934
Dmd_Human	3055	TSVQGPWERAISP. KVPYYINHETQTTQWDHPKMTELY	P11532
Dmd_Mouse	3048	TSVQGPWERAISP. KVPYYINHETQTTQWDHPKMTELY	P11531
FE65_Rat	42	SDLPAGWMRVQDTS. GTYYWHI. PTGTTQWEPPGRASPS	P46933
30 Msb1/Human	249	IVLPPNWKATARDPE. GKIYYHVIIRQTQWDPPPTWESPG	
IQGA_Human	679	GDNSKWKVHKHWKVG. GYYYYHNLETOEGGWDEPPNFVQN	P46940
FBP11-1_Mouse	1 WTEHKSPD. GRYYYYNTETKQSTWEKPDDLKTP	U40747
FBP11-2_Mouse	36	LLSKCPWKTYKSDS. GKPPYYNSQTKESRWAKP.	U40747

(ii) ノーザンブロット

ヒト各組織ポリ(A)⁺RNA がブロットしてある Multi tissue Northern Blot (Clontech 社製) を mRNA ソースとして用いた。プローブとして、完全長 HP03494 cDNA の EcoRI-NotI 断片を、ランダムプライマーラベリングキット(Pharmacia 社製)により放射能ラベルして用いた。ノーザンブロットハイブリダイゼーションの条件はすべて、キットに付属のプロトコールに従った。心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、すい臓、脾臓、胸腺、前立腺、睾丸、卵巣、小腸、大腸、末梢血すべてに約 3kb のハイブリダイゼーションバンドが得られ、この蛋白質はハウスキーピングなものであることが示唆された。

10 (iii) インビトロ翻訳による蛋白質合成

この発明のポリヌクレオチド (cDNA) を有するプラスミドベクターを用いて、T_NT ウサギ網状赤血球溶解物キット (プロメガ社製) によるインビトロ転写／翻訳を行なった。この際 [35S] メチオニンを添加し、発現産物をラジオアイソトープでラベルした。いずれの反応もキットに付属のプロトコールに従って行なった。プラスミド 2 μg を、T_NT ウサギ網状赤血球溶解物 12.5 μl、緩衝液 (キットに付属) 0.5 μl、アミノ酸混合液 (メチオニンを含まない) 2 μl、[35S] メチオニン (アマーシャム社) 2 μl (0.35MBq/μl)、T7RNA ポリメラーゼ 0.5 μl、RNasin 20U を含む総量 25 μl の反応液中で 30℃で 90 分間反応させた。反応液 3 μl に SDS サンプリングバッファー (125mM トリス塩酸緩衝液、pH 6.8、120mM 2-メルカプトエタノール、2% SDS 溶液、0.025%プロモフェノールブルー、20%グリセロール) 2 μl を加え、95℃3分間加熱処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。オートラジオグラフィーを行ない、翻訳産物の分子量を求めた。その結果、このクローンは、ORF から予想される分子量 80,618 とほぼ同じ 80kDa の翻訳産物を生成した。

(iv) 大腸菌による GST 融合蛋白質の発現

25 EcoRI 認識部位を付加した翻訳開始コドンから始まる 26 mer のセンスプライマー (配列番号 4) と SalI 認識部位を付加した停止コドンまでを含む 26 mer のアンチセンスプライマー (配列番号 5) を用い、pHP03494 を鋳型として PCR により翻訳領域を増幅した。PCR 産物を EcoRI で消化し、pGEX-5X-1(Pharmacia 社製)の EcoRI 部位に挿入した。塩基配列

を確認した後、宿主大腸菌 BL21 の形質転換を行った。LB 培地中で 37℃で5時間培養し、IPTG を最終濃度が 0.4 mM になるように加え、さらに 37℃で 2.5 時間培養した。菌体を遠心により分離し、溶解溶液 (50 mM Tris-HCl (pH7.5) , 1mM EDTA-1% Triton X-100 , 0.2% SDS, 0.2 mM PMSF) に溶かし、一度-80℃で凍結させ融解させた後、超音波破碎を行った。1000 × g で 30 分遠心し、上清にグルタチオンセファロース 4B を加え、4℃で 1 時間インキュベートした。ビーズを十分洗浄した後、溶出溶液 (10 mM Tris-50 mM グルタチオン) で融合蛋白質を溶出した。その結果、分子量約 110 kDa の GST-HP03494 融合蛋白質を得た。

10 (v) 抗体作製

上記の融合蛋白質を抗原として家兔に常法により免疫を行い抗血清を得た。抗血清はまず、40%飽和硫酸沈殿画分を GST アフィニティーカラムにより GST 抗体を除いた。素通り画分をさらに GST-HP03494 の抗原カラムにより精製した。

15 (vi) ウェスタンブロット

ヒトフィブロサルコーマ細胞株 HT-1080 の溶解物を SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜ブロットした後、5%スキムミルクを含む 0.05% Tween20-PBS (TPBS) で 1 時間室温でブロッキングし、抗体を TPBS で 10000 倍希釈したものと 1 時間インキュベートした。TPBS で 3 回洗浄し、さらに TPBS で 10000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG と 1 時間インキュベートした。TPBS で 4 回洗浄し、ECL 試薬 (Amersham 社製) により発光させて検出したところ、分子量 80kDa のシグナルが得られた。この分子量はウサギ無細胞翻訳系による蛋白質のインビトロ翻訳産物の分子量と一致していた。

(vii) GFP 融合蛋白質の発現

25 EcoRI 認識部位を付加した翻訳開始コドンから始まる 26 mer のセンスプライマー (配列番号 4) と Sal I 認識部位を付加した停止コドンまでを含む 26 mer のアンチセンスプライマー (配列番号 5) を用い、pHP03494 を鋳型として PCR により翻訳領域を増幅した。PCR 産物を EcoRI、Sal I で消化し、GFP 融合蛋白質発現用ベクター pEGFP-C2(Clontech

社製)の EcoRI 部位に挿入した。塩基配列を確認した後、得られた pEGFP-C2-HP03494 を
リポフェクション法により HeLa 細胞にトランスフェクトした。蛍光顕微鏡により観察した
ところ pEGFP-C2 をトランスフェクトした細胞では、細胞全体に蛍光が見られるのに対し、
pEGFP-C2-HP03494 では核のみに蛍光が見られた。この結果から HP03494 は核に存在す
る蛋白質であることが示された。

(viii) RNA ポリメラーゼ II C 末端ドメイン(CTD)との結合

BamHI 認識部位を付加した翻訳開始コドン から始まる 33 mer のセンスプライマー (配
列番号 6) と EcoRI 認識部位を付加した停止コドンまでを含む 33 mer のアンチセンスプラ
イマー (配列番号 7) を用い、pHP03494 を鋳型として PCR により WW ドメインをコード
する翻訳領域を増幅した。PCR 産物を BamHI、EcoRI で消化し、pGEX-5X-1(Pharmacia
社製)の BamHI-EcoRI 部位に挿入した。これを(iv)と同様にして大腸菌内で発現させ、GST
と HP03494 の WW ドメインの融合蛋白質 GST-HP03494WW を得、これを SDS-PAGE
で分離した後、PVDF 膜に転写し、³²P ラベルした GST-CTD または、核抽出物によりリン酸
化した ³²P-GST-pCTD (リン酸化体) (Hirose, Y and Manley, J. L. (1998) Nature, 395,
93-96)とインキュベートし、ファウエスタン法(Kaelin, Jr.et al., (1992) Cell, 70, 351-
364)により検出した。HP03494 の WW ドメインはリン酸化された CTD とより強く結合す
ることが示された。このことから、この発明の蛋白質は転写調節に関与していることが示唆さ
れた。

産業上の利用可能性

この出願は、ヒト細胞の核に存在する新規蛋白質、この蛋白質をコードするポリヌクレオチ
ド (ヒト cDNA およびゲノム DNA 断片)、およびこのヒト核蛋白質に対する抗体を提供す
る。この発明の蛋白質および抗体は、癌などの病態の診断および治療などに有用である。この
ポリヌクレオチドを用いることにより、この蛋白質を大量に発現することができる。この蛋白
質と結合する低分子化合物をスクリーニングすることによる、新しい型の抗腫瘍剤等の医薬を
探索することができる。

請求の範囲

1. 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、単離・精製されたヒト核蛋白質。
- 5 2. 請求項 1 の蛋白質をコードし、配列番号 2 の塩基配列を含むポリヌクレオチド。
3. 配列番号 2 の塩基配列からなる請求項 3 のポリヌクレオチド。
4. 配列番号 3 またはその一部連続配列からなるポリヌクレオチドがストリンジェントな
10 条件下でハイブリダイズするヒトゲノム DNA 断片。
5. 請求項 2 または 3 のポリヌクレオチドをインビトロ翻訳あるいは宿主細胞内で発現し
うる発現ベクター。
- 15 6. 請求項 5 の発現ベクターによる形質転換体であって、請求項 1 のヒト核蛋白質を生産
しうる形質転換細胞。
7. 請求項 1 のヒト核蛋白質に対する抗体。

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Human nucleoproteins having WW domain and polynucleotides encoding
the proteins

5 <130> 00-F-061PCT

<140>

<141>

<150> JP11-332572

<151> 1999-11-24

10 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 704

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Asn Glu Asn His Gly Ser Pro Arg Glu Glu Ala Ser Leu Leu

1

5

10

15

Ser His Ser Pro Gly Thr Ser Asn Gln Ser Gln Pro Cys Ser Pro Lys

20

20

25

30

Pro Ile Arg Leu Val Gln Asp Leu Pro Glu Glu Leu Val His Ala Gly

35

40

45

Trp Glu Lys Cys Trp Ser Arg Arg Glu Asn Arg Pro Tyr Tyr Phe Asn

50

55

60

25 Arg Phe Thr Asn Gln Ser Leu Trp Glu Met Pro Val Leu Gly Gln His

65

70

75

80

Asp Val Ile Ser Asp Pro L u Gly Leu Asn Ala Thr Pro Leu Pro Gln

85

90

95

This Page Blank (uspto)

Asp S r Ser Leu Val Glu Thr Pro Pro Ala Glu Asn Lys Pro Arg Lys
 100 105 110
 Arg Gln Leu Ser Glu Glu Gln Pro Ser Gly Asn Gly Val Lys Lys Pro
 115 120 125
 5 Lys Ile Glu Ile Pro Val Thr Pro Thr Gly Gln Ser Val Pro Ser Ser
 130 135 140
 Pro Ser Ile Pro Gly Thr Pro Thr Leu Lys Met Trp Gly Thr Ser Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Lys Gln Gln Ala Ala Leu Leu Arg Pro Thr Glu Val Tyr Trp
 10 165 170 175
 Asp Leu Asp Ile Gln Thr Asn Ala Val Ile Lys His Arg Gly Pro Ser
 180 185 190
 Glu Val Leu Pro Pro His Pro Glu Val Glu Leu Leu Arg Ser Gln Leu
 195 200 205
 15 Ile Leu Lys Leu Arg Gln His Tyr Arg Glu Leu Cys Gln Gln Arg Glu
 210 215 220
 Gly Ile Glu Pro Pro Arg Glu Ser Phe Asn Arg Trp Met Leu Glu Arg
 225 230 235 240
 Lys Val Val Asp Lys Gly Ser Asp Pro Leu Leu Pro Ser Asn Cys Glu
 20 245 250 255
 Pro Val Val Ser Pro Ser Met Phe Arg Glu Ile Met Asn Asp Ile Pro
 260 265 270
 Ile Arg Leu Ser Arg Ile Lys Phe Arg Glu Glu Ala Lys Arg Leu Leu
 275 280 285
 25 Phe Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Arg Arg Leu Ile Glu Ser Arg Ser Ala
 290 295 300
 Ser Pro Asp Ser Arg Lys Val Val Lys Trp Asn Val Glu Asp Thr Phe
 305 310 315 320

This Page Blank (usp14)

Ser Trp Leu Arg Lys Asp His Ser Ala Ser Lys Glu Asp Tyr Met Asp
 325 330 335
 Arg Leu Glu His Leu Arg Arg Gln Cys Gly Pro His Val Ser Ala Ala
 340 345 350
 5 Ala Lys Asp Ser Val Glu Gly Ile Cys Ser Lys Ile Tyr His Ile Ser
 355 360 365
 Leu Glu Tyr Val Lys Arg Ile Arg Glu Lys His Leu Ala Ile Leu Lys
 370 375 380
 Glu Asn Asn Ile Ser Glu Glu Val Glu Ala Pro Glu Val Glu Pro Arg
 10 385 390 395 400
 Leu Val Tyr Cys Tyr Pro Val Arg Leu Ala Val Ser Ala Pro Pro Met
 405 410 415
 Pro Ser Val Glu Met His Met Glu Asn Asn Val Val Cys Ile Arg Tyr
 420 425 430
 15 Lys Gly Glu Met Val Lys Val Ser Arg Asn Tyr Phe Ser Lys Leu Trp
 435 440 445
 Leu Leu Tyr Arg Tyr Ser Cys Ile Asp Asp Ser Ala Phe Glu Arg Phe
 450 455 460
 Leu Pro Arg Val Trp Cys Leu Leu Arg Arg Tyr Gln Met Met Phe Gly
 20 465 470 475 480
 Val Gly Leu Tyr Glu Gly Thr Gly Leu Gln Gly Ser Leu Pro Val His
 485 490 495
 Val Phe Glu Ala Leu His Arg Leu Phe Gly Val Ser Phe Glu Cys Phe
 500 505 510
 25 Ala Ser Pro Leu Asn Cys Tyr Phe Arg Gln Tyr Cys Ser Ala Phe Pro
 515 520 525
 Asp Thr Asp Gly Tyr Phe Gly Ser Arg Gly Pro Cys Leu Asp Phe Ala
 530 535 540

This Page Blank (uspto)

Pro Leu Ser Gly Ser Ph Glu Ala Asn Pro Pro Phe Cys Glu Glu Leu
 545 550 555 560
 Met Asp Ala Met Val Ser His Phe Glu Arg Leu Leu Glu Ser Ser Pro
 565 570 575
 5 Glu Pro Leu Ser Phe Ile Val Phe Ile Pro Glu Trp Arg Glu Pro Pro
 580 585 590
 Thr Pro Ala Leu Thr Arg Met Glu Gln Ser Arg Phe Lys Arg His Gln
 595 600 605
 Leu Ile Leu Pro Ala Phe Glu His Glu Tyr Arg Ser Gly Ser Gln His
 10 610 615 620
 Ile Cys Lys Lys Glu Glu Met His Tyr Lys Ala Val His Asn Thr Ala
 625 630 635 640
 Val Leu Phe Leu Gln Asn Asp Pro Gly Phe Ala Lys Trp Ala Pro Thr
 645 650 655
 15 Pro Glu Arg Leu Gln Glu Leu Ser Ala Ala Tyr Arg Gln Ser Gly Arg
 660 665 670
 Ser His Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ala Lys Asp
 675 680 685
 Arg Asp Ser Gly Arg Glu Gln Gly Pro Ser Arg Glu Pro His Pro Thr
 20 690 695 700

<210> 2

<211> 2112

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25 <400> 2

atggccaatg agaatcacgg cagcccccgaggaggaagcgt ccctgctgag tcaactcccca 60
 ggtacctcca atcagagcca gccctgttct ccaaagccaa tccgcctggt tcaggacctc 120
 ccagaggagc tgggtcatgc aggctgggag aagtgctgga gccggaggga gaatcgtccc 180

This Page Blank (uspto)

tactacttca accgattcac caaccagtcc ctgtgggaga tgcccggtgct ggggcagcac 240
gatgtgattt cggacccttt ggggctgaat gcgacccac tgccccaaga ctcaagcttg 300
gtggaaactc ccccggtga gaacaagccc agaaagcggc agctctcgga agagcagcca 360
agcggcaatg gtgtgaagaa gccaagatt gaaatcccag tgacacccac aggccagtcg 420
5 gtgcccagct ccccagtat ccaggaacc ccaacgctga agatgtggg tacgtccct 480
gaagataaac agcaggcagc tctcctacga cccactgagg tctactggga cctggacatc 540
cagaccaatg ctgtcatcaa gcaccggggg ccttcagagg tgctgcccc gcatcccgaa 600
gtggaactgc tccgctctca gctcatcctg aagcttcggc agcactatcg ggagctgtgc 660
cagcagcgag agggcattga gcctccacgg gactcttca accgctggat gctggagcgc 720
10 aaggtggtag acaaaggatc tgaccccctg ttgccagca actgtgaacc agtcgtgtca 780
ccttccatgt ttcgtgaaat catgaacgac attcctatca ggttatccc aatcaagttc 840
cgggaggaag ccaagcgct gctctttaa tatgcgagg cgcagcg gctcatcgag 900
tccaggagt catccctga cagtaggaag gtggtcaa atggaatgtga agacacctt 960
agctggcttc ggaaggacca ctacgctcc aaggaggact acatggatcg cctggagcat 1020
15 ctgcgaggc agtgtggccc ccacgtctcg gccgcagcca aggactccgt ggaaggcatc 1080
tgcagtaaga tctaccacat ctccctggag tacgtcaaac ggatccgaga gaagcacctt 1140
gccatcctca aggaacaaa catctcagag gaggtggagg cccctgaggt ggagccccgc 1200
ctagtgtact gctaccagt cgggtggct gtgtctgcac cgccatgcc cagcgtggag 1260
atgcacatgg agaacaacgt ggtctgcac cggtataagg gagagatgg caaggtcagc 1320
20 cgcaactact tcagcaagct gtggctcctt taccgctaca gctgcattga tgactctgcc 1380
tttgagaggt tcctgccccg ggtctgggtgt cttctccgac ggtaccagat gatgttcggc 1440
gtgggcctct acgaggggac tggcctgcag ggatcgctgc ctgtgcatgt ctttgaggcc 1500
ctccaccgac tctttggcgt cagcttcgag tgcttcgcct caccctcaa ctgctacttc 1560
cgccagtact gttctgcctt ccccgacaca gacggctact ttggtcccg cgggccctgc 1620
25 ctagactttg ctccactgag tgggtcattt gaggccaacc ctccctctg cgaggagctc 1680
atggatgcca tggctctca ctttgagaga ctgcttgaga gctcaccgga gccctgtcc 1740
ttcatcgtgt tcatccctga gtggcgggaa ccccaacac cagcgtcac ccgcatggag 1800
cagagccgct tcaaagcca ccagttgatc ctgcctgcct ttgagcatga gtaccgcagt 1860

This Page Blank (uspto;

ggctcccagc acatctgcaa gaaggaggaa atgcactaca aggccgtcca caacacggct 1920
 gtgtctttcc tacagaacga ccctggcttt gccaaagtggg cgccgacgcc tgaacggctg 1980
 caggagctga gtgtgccta ccggcagtcg gcccgagcc acagctctgg ttcttctca 2040
 tcgtctcct cggaggccaa ggaccgggac tcgggccgtg agcagggtcc tagccgcgag 2100

5 cctcacccca ct 2112

<210> 3

<211> 2669

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> CDS

<222> (292).. (2406)

<400> 3

acacaagatg gcggcagcgg cgctggggag ggcgaggcgg aggcggcaaa acgggcggtc 60
 15 gaggagaacg tgtagccgcg tcccctccag tccgctccgg gcagctgctg atgcaaggaa 120
 tcccctgggc tcccgccac tccactgctg accagcccat tcgcctgtgc tgagtcttcc 180
 tgcaggcctt tccttgctc tgtgggaccc tgtgggggtc catccggctg gagaagaaaa 240
 gcctctcatg ctaacgttgc agaccccaga gggctcctgtg tgggtgtgga g atg gcc 297

Met Ala

20

1

aat gag aat cac ggc agc ccc cgg gag gaa gcg tcc ctg ctg agt cac 345

Asn Glu Asn His Gly Ser Pro Arg Glu Glu Ala Ser Leu Leu Ser His

5

10

15

tcc cca ggt acc tcc aat cag agc cag ccc tgt tct cca aag cca atc 393

25 Ser Pro Gly Thr Ser Asn Gln Ser Gln Pro Cys Ser Pro Lys Pro Ile

20

25

30

cgc ctg gtt cag gac ctc cca gag gag ctg gtg cat gca ggc tgg gag 441

Arg Leu Val Gln Asp Leu Pro Glu Glu Leu Val His Ala Gly Trp Glu

This Page Blank (uspto)

	35	40	45	50	
	aag tgc tgg agc cgg agg gag aat cgt ccc tac tac ttc aac cga ttc	489			
	Lys Cys Trp Ser Arg Arg Glu Asn Arg Pro Tyr Tyr Phe Asn Arg Phe				
	55	60	65		
5	acc aac cag tcc ctg tgg gag atg ccc gtg ctg ggg cag cac gat gtg	537			
	Thr Asn Gln Ser Leu Trp Glu Met Pro Val Leu Gly Gln His Asp Val				
	70	75	80		
	att tcg gac cct ttg ggg ctg aat gcg acc cca ctg ccc caa gac tca	585			
	Ile Ser Asp Pro Leu Gly Leu Asn Ala Thr Pro Leu Pro Gln Asp Ser				
10	85	90	95		
	agc ttg gtg gaa act ccc ccg gct gag aac aag ccc aga aag cgg cag	633			
	Ser Leu Val Glu Thr Pro Pro Ala Glu Asn Lys Pro Arg Lys Arg Gln				
	100	105	110		
	ctc tcg gaa gag cag cca agc ggc aat ggt gtg aag aag ccc aag att	681			
15	Leu Ser Glu Glu Gln Pro Ser Gly Asn Gly Val Lys Lys Pro Lys Ile				
	115	120	125	130	
	gaa atc cca gtg aca ccc aca ggc cag tcg gtg ccc agc tcc ccc agt	729			
	Glu Ile Pro Val Thr Pro Thr Gly Gln Ser Val Pro Ser Ser Pro Ser				
	135	140	145		
20	atc cca gga acc cca acg ctg aag atg tgg ggt acg tcc cct gaa gat	777			
	Ile Pro Gly Thr Pro Thr Leu Lys Met Trp Gly Thr Ser Pro Glu Asp				
	150	155	160		
	aaa cag cag gca gct ctc cta cga ccc act gag gtc tac tgg gac ctg	825			
	Lys Gln Gln Ala Ala Leu Leu Arg Pro Thr Glu Val Tyr Trp Asp Leu				
25	165	170	175		
	gac atc cag acc aat gct gtc atc aag cac cgg ggg cct tca gag gtg	873			
	Asp Ile Gln Thr Asn Ala Val Ile Lys His Arg Gly Pro Ser Glu Val				
	180	185	190		

This Page Blank (uspto)

ctg ccc ccg cat ccc gaa gtg gaa ctg ctc cgc tct cag ctc atc ctg 921
 Leu Pro Pro His Pro Glu Val Glu Leu Leu Arg Ser Gln Leu Ile Leu
 195 200 205 210
 aag ctt cgg cag cac tat cgg gag ctg tgc cag cag cga gag ggc att 969
 5 Lys Leu Arg Gln His Tyr Arg Glu Leu Cys Gln Gln Arg Glu Gly Ile
 215 220 225
 gag cct cca cgg gag tct ttc aac cgc tgg atg ctg gag cgc aag gtg 1017
 Glu Pro Pro Arg Glu Ser Phe Asn Arg Trp Met Leu Glu Arg Lys Val
 230 235 240
 10 gta gac aaa gga tct gac ccc ctg ttg ccc agc aac tgt gaa cca gtc 1065
 Val Asp Lys Gly Ser Asp Pro Leu Leu Pro Ser Asn Cys Glu Pro Val
 245 250 255
 gtg tca cct tcc atg ttt cgt gaa atc atg aac gac att cct atc agg 1113
 Val Ser Pro Ser Met Phe Arg Glu Ile Met Asn Asp Ile Pro Ile Arg
 15 260 265 270
 tta tcc cga atc aag ttc cgg gag gaa gcc aag cgc ctg ctc ttt aaa 1161
 Leu Ser Arg Ile Lys Phe Arg Glu Glu Ala Lys Arg Leu Leu Phe Lys
 275 280 285 290
 tat gcg gag gcc gcc agg cgg ctc atc gag tcc agg agt gca tcc cct 1209
 20 Tyr Ala Glu Ala Ala Arg Arg Leu Ile Glu Ser Arg Ser Ala Ser Pro
 295 300 305
 gac agt agg aag gtg gtc aaa tgg aat gtg gaa gac acc ttt agc tgg 1257
 Asp Ser Arg Lys Val Val Lys Trp Asn Val Glu Asp Thr Phe Ser Trp
 310 315 320
 25 ctt cgg aag gac cac tca gcc tcc aag gag gac tac atg gat cgc ctg 1305
 Leu Arg Lys Asp His Ser Ala Ser Lys Glu Asp Tyr Met Asp Arg Leu
 325 330 335
 gag cat ctg cgg agg cag tgt ggc ccc cac gtc tgc gcc gca gcc aag 1353

This Page Blank (uspto)

Glu His L u Arg Arg Gln Cys Gly Pro His Val Ser Ala Ala Ala Lys
 340 345 350
 gac tcc gtg gaa ggc atc tgc agt aag atc tac cac atc tcc ctg gag 1401
 Asp Ser Val Glu Gly Ile Cys Ser Lys Ile Tyr His Ile Ser Leu Glu
 5 355 360 365 370
 tac gtc aaa cgg atc cga gag aag cac ctt gcc atc ctc aag gaa aac 1449
 Tyr Val Lys Arg Ile Arg Glu Lys His Leu Ala Ile Leu Lys Glu Asn
 375 380 385
 aac atc tca gag gag gtg gag gcc cct gag gtg gag ccc cgc cta gtg 1497
 10 Asn Ile Ser Glu Glu Val Glu Ala Pro Glu Val Glu Pro Arg Leu Val
 390 395 400
 tac tgc tac cca gtc cgg ctg gct gtg tct gca ccg ccc atg ccc agc 1545
 Tyr Cys Tyr Pro Val Arg Leu Ala Val Ser Ala Pro Pro Met Pro Ser
 405 410 415
 15 gtg gag atg cac atg gag aac aac gtg gtc tgc atc cgg tat aag gga 1593
 Val Glu Met His Met Glu Asn Asn Val Val Cys Ile Arg Tyr Lys Gly
 420 425 430
 gag atg gtc aag gtc agc cgc aac tac ttc agc aag ctg tgg ctc ctt 1641
 Glu Met Val Lys Val Ser Arg Asn Tyr Phe Ser Lys Leu Trp Leu Leu
 20 435 440 445 450
 tac cgc tac agc tgc att gat gac tct gcc ttt gag agg ttc ctg ccc 1689
 Tyr Arg Tyr Ser Cys Ile Asp Asp Ser Ala Phe Glu Arg Phe Leu Pro
 455 460 465
 cgg gtc tgg tgt ctt ctc cga cgg tac cag atg atg ttc ggc gtg ggc 1737
 25 Arg Val Trp Cys Leu Leu Arg Arg Tyr Gln Met Met Phe Gly Val Gly
 470 475 480
 ctc tac gag ggg act ggc ctg cag gga tog ctg cct gtg cat gtc ttt 1785
 Leu Tyr Glu Gly Thr Gly Leu Gln Gly Ser Leu Pro Val His Val Phe

This Page Blank (uspto)

	485	490	495	
	gag gcc ctc cac cga ctc ttt ggc gtc agc ttc gag tgc ttc gcc tca			1833
	Glu Ala Leu His Arg Leu Phe Gly Val Ser Phe Glu Cys Phe Ala Ser			
	500	505	510	
5	ccc ctc aac tgc tac ttc cgc cag tac tgt tct gcc ttc ccc gac aca			1881
	Pro Leu Asn Cys Tyr Phe Arg Gln Tyr Cys Ser Ala Phe Pro Asp Thr			
	515	520	525	530
	gac ggc tac ttt ggc tcc cgc ggg ccc tgc cta gac ttt gct cca ctg			1929
	Asp Gly Tyr Phe Gly Ser Arg Gly Pro Cys Leu Asp Phe Ala Pro Leu			
10	535	540	545	
	agt ggt tca ttt gag gcc aac cct ccc ttc tgc gag gag ctc atg gat			1977
	Ser Gly Ser Phe Glu Ala Asn Pro Pro Phe Cys Glu Glu Leu Met Asp			
	550	555	560	
	gcc atg gtc tct cac ttt gag aga ctg ctt gag agc tca ccg gag ccc			2025
15	Ala Met Val Ser His Phe Glu Arg Leu Leu Glu Ser Ser Pro Glu Pro			
	565	570	575	
	ctg tcc ttc atc gtg ttc atc cct gag tgg cgg gaa ccc cca aca cca			2073
	Leu Ser Phe Ile Val Phe Ile Pro Glu Trp Arg Glu Pro Pro Thr Pro			
	580	585	590	
20	gcg ctc acc cgc atg gag cag agc cgc ttc aaa cgc cac cag ttg atc			2121
	Ala Leu Thr Arg Met Glu Gln Ser Arg Phe Lys Arg His Gln Leu Ile			
	595	600	605	610
	ctg cct gcc ttt gag cat gag tac cgc agt ggc tcc cag cac atc tgc			2169
	Leu Pro Ala Phe Glu His Glu Tyr Arg Ser Gly Ser Gln His Ile Cys			
25	615	620	625	
	aag aag gag gaa atg cac tac aag gcc gtc cac aac acg gct gtg ctc			2217
	Lys Lys Glu Glu Met His Tyr Lys Ala Val His Asn Thr Ala Val Leu			
	630	635	640	

This Page Blank (uspto)

ttc cta cag aac gac cct ggc ttt gcc aag tgg gcg ccg acg cct gaa 2265

Phe Leu Gln Asn Asp Pro Gly Phe Ala Lys Trp Ala Pro Thr Pro Glu

645

650

655

cgg ctg cag gag ctg agt gct gcc tac cgg cag tca ggc cgc agc cac 2313

5 Arg Leu Gln Glu Leu Ser Ala Ala Tyr Arg Gln Ser Gly Arg Ser His

660

665

670

agc tct ggt tct tcc tca tgc tcc tcc tgc gag gcc aag gac cgg gac 2361

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ala Lys Asp Arg Asp

675

680

685

690

10 tgc ggc cgt gag cag ggt cct agc cgc gag cct cac ccc act taa 2406

Ser Gly Arg Glu Gln Gly Pro Ser Arg Glu Pro His Pro Thr

695

700

705

catatcctgc ggggaggagg agccccaggg gtgctagtct ggactgctgg gactcgggcc 2466

cctggggcct cagagggacc ccggctgcc ctgacatatg aagattatgg ttctgccagg 2526

15 gctccctcc ctgcctgtcc ccaagtctc acctcaaact ccctccaagt cccatgtata 2586

taggtcctga tgccttccca accccgcccc tcacctgtt gccacctgtt ttcatttgta 2646

aaaggaaata cagaaacccc ccc 2669

<210> 4

<211> 26

20 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Synthesized oligonucleotide

<400> 4

25 ccgaattcat ggccaatgag aatcac

26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

This Page Blank (uspto)

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Synthesized oligonucleotide

<400> 5

5 ccgtcgactt aagtggggtg aggctc

26

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10 <220>

<213> Synthesized oligonucleotide

<400> 6

cgaggatccg ttcaggacct cccagaggacg cta

33

<210> 7

15 <211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Synthesized oligonucleotide

20 <400> 7

cgagaattcc gaaatcacat cgtgctgccc cag

33

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 44, (October 1999), Morris P., et al., "Phospho-Carboxyl-Terminal Domain Binding and the Role of aProlyl Isomerase in Pre-mRNA 3'-End Formation", pp. 31583-31587	1-7
A	EMBL/GenBank/DDBJ, Accession No. AL137437	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 January, 2001 (16.01.01)Date of mailing of the international search report
23 January, 2001 (23.01.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

This Page Blank (uspto)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)
EMBL/Genbank/DBJ/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 44, (10月.1999), Morris P., et al. "Phospho-Carboxyl-Terminal Domain Binding and the Role of a Prolyl Isomerase in Pre-mRNA 3'-End Formation", p. 31583-31587	1-7
A	EMBL/GenBank/DBJ, Accession No. AL137437	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.01.01

国際調査報告の発送日

23.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

印

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

This Page Blank (uspto)